

エチクロゼート試験法

1. 分析対象化合物

エチクロゼート、CIA [5-クロロ-3 (1*H*) -インダゾール酢酸]

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC (UV))
液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS)

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

トリフルオロ酢酸 高速液体クロマトグラフ用トリフルオロ酢酸

CIA標準品 本品はCIA99%以上を含む。

4. 試験溶液調製法

1) 抽出

検体約1 kgを精密に量り、1 mol/L塩酸500 mLを量って加え、細切均一化する。

検体20.0 gに相当する試料に5 mol/L塩酸2 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、5 mol/L塩酸2 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過を行う。得られたろ液を合わせて、40°C以下で約40 mLまで濃縮する。これに25%塩化ナトリウム溶液100 mL及び5 mol/L塩酸2 mLを加え、エーテル・*n*-ヘキサン混液 (2 : 1) 100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール5 mLを加えて溶かす。

2) 加水分解

1) で得られた溶液に4 mol/L水酸化カリウム溶液5 mLを加え、栓をして、室温で時々振り混ぜながら1時間放置する。反応液に25%塩化ナトリウム溶液40 mL及び5 mol/L塩酸5 mLを加え、エーテル・*n*-ヘキサン混液 (2 : 1) 50 mLずつで2回振とう抽出する。この抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル5 mLを加えて溶かす。

3) 精製

クロマトグラフ管 (内径15 mm) に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径63 ~ 200 μm) 5 gを酢酸エチルに懸濁させて充てんし、上に無水硫酸ナトリウム約5 gを積層する。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル15 mL及び酢酸・酢酸エチル混液 (0.1 : 100) 30 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、酢酸・酢酸エチル・メタノール混液 (0.1 : 80 : 20) 150 mLを注入する。溶出液を

40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.01%トリフルオロ酢酸・メタノール混液（13：7）に溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

CIA標準品の0.1～5 mg/L 0.01%トリフルオロ酢酸・メタノール混液（13：7）溶液を数点調製し、それぞれ20 μLをHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液20 μLをHPLCに注入し、5の検量線でCIAの含量を求め、次式によりCIAを含むエチクロゼートの含量を求める。

$$\text{エチクロゼート（CIAを含む）の含量} = \text{CIAの含量} \times 1.13$$

7. 測定条件

1) HPLC

検出器：UV（波長299 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm） 内径4.6 mm、長さ150 mm

カラム温度：40℃

移動相：0.01%トリフルオロ酢酸・メタノール混液（13：7）

保持時間の目安：20分

2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm） 内径2～3 mm、長さ150 mm

カラム温度：40℃

移動相：0.01%トリフルオロ酢酸・メタノール混液（13：7）

主なイオン： m/z 211、197

注入量：5 μL

保持時間の目安：20分

8. 定量限界

0.05 mg/kg（エチクロゼートとして）

9. 留意事項

1) 分析値

エチクロゼートは、エチクロゼートをCIAに変換した後、CIAについて定量を行い、その含量に係数を乗じてエチクロゼートの含量に換算し、これを分析値とすること。

2) 試験法の概要

エチクロゼート及びCIAを試料から塩酸酸性下でアセトンで抽出し、エーテル・*n*-ヘキサン混液に転溶する。メタノール・水酸化カリウム溶液でエチクロゼートをCIAに加水分解し、シリカゲルカラムで精製した後、CIAをHPLC(UV)で測定し、LC/MSで確認する方法である（文献1）。

3) 注意点

- (1) エチクロゼート及びCIAは分解又は吸着しやすいので、抽出から加水分解までを速やかに行う必要がある。
- (2) 本試験法の他に、エチクロゼート及びCIAを試料から抽出し、加水分解の後、エーテル、三フッ化ホウ素及び*n*-ブタノール混合物によりブチルエステル化し、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC(FTD)又はGC(NPD)で測定する方法もある（文献2）。

10. 参考文献

- 1) 高附ら, 食品衛生学雑誌, 43, 30-34 (2002)
- 2) 今月の農薬編集室編「改訂4版農薬登録保留基準ハンドブック」p.138-140, 化学工業日報社 (2003)

11. 類型

C